Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 16, No. 1, Apr. May. 2020, p. 117- 129

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 16، شماره 1،فروردین-اردیبهشت 1399 ص. 129-117

اصلاح شیمیایی کیتوزان از طریق واکنش گلیکوزیلاسیون غیرآنزیمی به‌منظور بهبود خواص ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی آن

فخری شهیدی[1*]- فریده طباطبایی یزدی[1]- مجید نوش‌کام[2]- زهرا زارعی[3]- فرشته فلاح[3]

تاریخ دریافت: 1397/07/12
تاریخ پذیرش: 1397/12/13

چکیده

واکنش گلیکوزیلاسیون غیرآنزیمی (مایلارد) به‌طور گسترده‌ای جهت بهبود ویژگی‌های بیولوژیکی و عملکردی پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها استفاده شده است. در این پژوهش، پری‌بیوتیک اینولین و قندهای پیش‌ساز آن (گلوکز و فروکتوز) از طریق واکنش مایلارد با کیتوزان گلیکوزیله گردید. تغییرات pH، محصولات حد واسط و نهایی، تغییرات ساختاری، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و ویژگی ضدمیکروبی سامانه‌های کانژوگه مورد بررسی قرار گرفت. فرآیند حرارتی سبب کاهش معنی‌دار pH سامانه‌های کیتوزان- ساکارید گردید. بالاترین شدت ترکیبات حد واسط (A_{294nm}) و کمترین شدت قهوه‌ای شدن (A_{420nm}) در سامانه کیتوزان- فروکتوز مشاهده شد؛ در حالیکه کانژوگه کیتوزان- اینولین بیشترین A_{420nm} و کمترین نسبت تبدیل محصولات میانی به نهایی (A_{294nm}/A_{420nm}) را نشان داد. اتصال کووالانی کیتوزان به ساکاریدهای اینولین، فروکتوز و گلوکز با استفاده از طیف‌سنج فروسرخ تبدیل فوریه (FTIR) تأیید گردید. واکنش مایلارد منجر به تشکیل محصولاتی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجه شد و به استثنای سامانه کیتوزان- گلوکز، سایر نمونه‌های کانژوگه حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی کمتری نسبت به نمونه‌های غیرکانژوگه نشان دادند که بیانگر بهبود فعالیت ضدمیکروبی کیتوزان بعد از واکنش با اینولین و فروکتوز می‌باشد. مطابق نتایج، کانژوگه‌های مایلارد، به‌ویژه اینولین- کیتوزان می‌تواند نوع جدیدی از ترکیبات زیست‌فعال بر پایه‌ی پری‌بیوتیک با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی جهت استفاده در صنایع غذایی باشد.

واژه‌های کلیدی: اینولین، آنتی‌اکسیدان، ضدمیکروب، کیتوزان، واکنش مایلارد.

مقدمه

اکسیداسیون چربی‌ها با گسترش بد طعمی و تولید محصولات جانبی بالقوه سمی در مواد غذایی، قادر به کاهش ارزش تغذیه‌ای و بروز بیماری‌های مرتبط با این ترکیبات است (Zhong *et al.*, 2015). آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانند دی بوتیل هیدروکسی تولوئن[4] (BHT)، دی بوتیل هیدروکسی آنیزول[5] (BHA) و ترابوتیل هیدروکوئینون[6] (TBHQ) به‌طور گسترده‌ای برای جلوگیری از این واکنش از طریق پایان دادن به واکنش‌های زنجیره رادیکالی استفاده می‌شوند. با اینحال نگرانی‌های اساسی در ارتباط با کاربرد این آنتی‌اکسیدان‌ها به دلیل اثرات سمی بالقوه آن‌ها بر سلامت انسان وجود دارد (Shahidi, 2000). محصولات واکنش مایلارد[7] (MRPs) که به‌طور گسترده‌ای طی فرایند حرارتی و نگهداری مواد غذایی تولید می‌شوند، امکان استفاده به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و با منشأ مواد غذایی جهت به تأخیر انداختن یا جلوگیری از اکسیداسیون چربی‌ها را دارا می‌باشند (Yuan *et al.*, 2015).

واکنش مایلارد با کانژوگه شدن ترکیبات حاوی گروه‌های کربونیل و آمین آزاد و بدون افزودن هیچ‌گونه ماده شیمیایی اضافی شروع می‌شود و گزارش شده است که تحت شرایط کنترل شده می‌تواند به‌عنوان روشی ایمن جهت بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ویژگی‌های حسی مواد غذایی به‌کار رود (de Oliveira *et al.*, 2016). باور همگانی بر این است که رژیم غذایی روزانه انسان حاوی مقادیر قابل‌توجهی از MRPs می‌باشد (O'Brien *et al.*, 1989). ترکیباتی از قبیل ملانوئیدین ها و محصولات بازآرایی آمادوری طی این واکنش تولید می‌شوند که فعالیت شلاته کنندگی و مهار رادیکال‌های اکسیژن از خود نشان می‌دهند (Wang *et al.*, 2013). لازم به ذکر است که فعالیت ضدمیکروبی، ضدفشارخون بالا و پری‌بیوتیکی ملانوئیدین ها نیز گزارش شده است (Wang *et al.*, 2011). از ویژگی‌های بارز دیگر این واکنش می‌توان به تولید ترکیباتی اشاره داشت که اثر ممانعت کنندگی بر آنزیم پلی فنل اکسیداز داشته و در نتیجه قادر به جلوگیری از واکنش قهوه‌ای شدن آنزیمی در میوه‌جات و سبزیجات هستند

1، 2 و 3- به‌ترتیب استاد، دانشجوی دکتری و دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه علوم وصنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
(* - نویسنده مسئول: Email: fshahidi@um.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v16i1.75740

4 Butylated hydroxytoluene
5 Butylated hydroxyanisole
6 Tert-butyl hydroquinone
7 Maillard reaction products

(Yuan *et al*., 2015). اگرچه ترکیبات متنوعی که طی واکنش مایلارد تولید می‌شوند ممکن است با کاهش هضم پذیری پروتئین‌ها و تولید بعضی ترکیبات سمی و جهش‌زا سبب تغییر ارزش تغذیه‌ای مواد غذایی شوند (Martins *et al*., 2000). سازوکارهای متفاوتی از قبیل شلاته کردن یون‌های فلزی، شکستن زنجیره رادیکالی، تخریب پراکسید هیدروژن و مهار کردن گونه‌های واکنشگر اکسیژن برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی MRPs گزارش شده است (Nooshkam and Madadlou, 2016a)، ظرفیت ضدمیکروبی MRPs، به‌ویژه ملانوئیدین‌ها عمدتاً به اثر شلاته کنندگی این ترکیبات نسبت داده شده است (Rufián-Henares and Morales, 2008a). در این تحقیق از کیتوزان و اینولین و واحدهای تشکیل دهنده آن برای تولید MRPs استفاده شد.

کیتوزان به‌عنوان مشتق N- دی استیل شده‌ی کیتین، برخلاف اکثر پلی‌ساکاریدهای طبیعی مانند سلولز، دکستران، پکتین، آلژینیک اسید، آگار، آگاروز و کاراگینان که خنثی یا اسیدی می‌باشند، به شدت قلیایی بوده و دارای ویژگی‌های بارزی از قبیل تشکیل فیلم و شلاته کردن یون‌های فلزی است. این پلی‌ساکارید از طریق واکنش دآسیله شدن[1] و با حذف گروه‌های استامید ($-NHCOCH_3$) از موقعیت کربن شماره 2 کیتین تولید می‌شود (Kumar, 2000). فعالیت ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ممانعت از قهوه‌ای شدن آنزیمی کیتوزان نیز گزارش شده است و عواملی مختلفی مانند نوع کیتوزان (درجه استیلاسیون و وزن مولکولی)، pH محیط، دما، حضور اجزای تشکیل‌دهنده مواد غذایی و غیره بر ظرفیت ضدمیکروبی آن مؤثر هستند (Devlieghere *et al*., 2004). روش‌های مختلفی از قبیل واکنش مایلارد (Chang *et al*., 2011; Gullón *et al*., 2016)، پرتودهی (Matsuhashi and Kume, 1997) و تشکیل کمپلکس با یون‌های Ag، Cu، Zn و Fe (Wang *et al*., 2004; Wang *et al*., 2005) جهت بهبود ویژگی‌های بیولوژیکی، به‌ویژه فعالیت ضدمیکروبی کیتوزان معرفی شده‌اند. با توجه به اثرات جانبی دوزهای بالای پرتودهی بر سلامت انسان و همچنین پیوند الکتروستاتیکی بین کمپلکس‌های کیتوزان و یون‌های یاد شده که سبب ناپایداری کمپلکس در برابر تغییرات pH محیط می‌گردد، توجه ویژه‌ای به کمپلکس‌های کیتوزان با پیوندهای کووالانسی مانند کانژوگه‌های کیتوزان حاصل از واکنش مایلارد شده است، زیرا این ترکیبات نسبت به دماهای بالا و پایین (فریز کردن)، شرایط اسیدی و تغییرات قدرت یونی محیط پایداری بالایی نشان می‌دهند (de Oliveira *et al*., 2016). علاوه بر این، کانژوگه‌های مایلارد دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی قابل توجهی می‌باشند. بنابراین می توان از این ترکیبات بعنوان مواد افزودنی زیست فعال با ویژگی‌های عملکردی و بیولوژیکی قابل توجه در مواد غذایی، به‌ویژه غذاهای اسیدی مانند آمیوه‌جات استفاده کرد.

اینولین الیگومری با واحدهای تکرارشونده فروکتوز با پیوند گلیکوزیدی $\beta(2\rightarrow1)$ و واحد انتهایی گلوکز می‌باشد. درجه‌ی پلیمریزاسیون اینولین بین 2-60 بوده و در پیاز، کنگر فرنگی، مارچوبه، تره، گندم و ریشه کاسنی مشاهده می‌شود (Kalyani Nair *et al*., 2010; Mutanda *et al*., 2014). این ترکیب به‌عنوان فیبر رژیمی شناخته شده و دارای فعالیت پری‌بیوتیکی و بعضی خواص مهم تکنولوژیکی (به‌عنوان جایگزین قند و چربی در محصولات کم‌چرب و عامل تغلیظ کننده، امولسیفایر و ژل دهنده) می‌باشد (Lopes *et al*., 2015). شاخص گلایسمی و مقدار انرژی‌زایی آن پایین بوده و به‌ترتیب 46 و 1/5 کیلوکالری در گرم گزارش شده است (Mcdevitt-Pugh and Meyer, 2005). اینولین توسط آنزیم‌های روده کوچک پستانداران مانند سوکراز، آلفاآمیلاز و مالتاز هیدرولیز نمی‌شود و در روده بزرگ به‌راحتی توسط گونه‌های بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیلوس مورد استفاده قرار می‌گیرد (Schaller-Povolny and Smith, 1999). برخی از ویژگی‌های فیزیولوژیکی آن از قبیل اثر ضدباکتریایی در برابر باکتری‌های بیماری‌زا، اثر ضدسرطانی، کاهش سطوح لیپید، اوره و اوریک اسید سروم خون، خطر بیماری قلبی- عروقی و افزایش جذب مواد معدنی به اثبات رسیده است (Karimi *et al*., 2015). حضور گلوکز، فروکتوز و فروکتان حاصل از فرایندهای آنزیمی طبیعی یا هیدرولیز سبب می‌شود که اینولین حاوی مقادیر مشخصی فعالیت احیاکنندگی باشد و درصد کل قند احیاکننده در آن حدود 4/1 درصد گزارش شده است (He, 2015). هدف از این تحقیق تولید محصولی زیست فعال با ظرفیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجه از طریق گلیکوزیلاسیون غیرآنزیمی (مایلارد) کیتوزان با اینولین و واحدهای تشکیل دهنده آن (گلوکز و فروکتوز) به‌منظور بهره‌مندی از ویژگی‌های بارز کیتوزان و اینولین در کنار هم می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کیتوزان (وزن مولکولی متوسط؛ 75-85 درصد استیل زدایی شده) و تری فنیل تترازولیوم کلراید[2] از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه شدند. اینولین زنجیره کوتاه (92 درصد محتوای اینولین و درجه پلیمریزاسیون ≤10) از شرکت آوا سلامت جاوید (ایران) خریداری گردید. سایر مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل اتانول 96 درصد (صنایع شیمیایی اتانول غدیر، ایران)، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک (پادتن طب، ایران)، فروکتوز، گلوکز، استیک اسید گلاسیال، تری کلرواستیک اسید، سدیم هیدروکسید، کلرید آهن و فری‌سیانید پتاسیم (مرک، آلمان) بودند.

1 Deacetylation

2 Triphenyltetrazolium chloride

محیط‌های کشت و سویه‌های میکروبی

محیط‌های کشت مولر هیلتون آگار، مولر هیلتون براث، سابروز دکستروز آگار و سابروز دکستروز براث (مرک، آلمان) تهیه شدند. سویه‌های باکتریایی *استافیلوکوکوس اورئوس*[1] ATCC 25923، *سودوموناس آئروژینوزا*[2] ATCC 27853، *اشرشیا کلی*[3] ATCC 25922، *باسیلوس سوبتیلیس*[4] ATCC 23857 کپک *آسپرژیلوس نایجر*[5] ATCC 16404 و مخمر *کاندیدا آلبیکنس*[6] PTCC 5027 از آزمایشگاه میکروبیولوژی صنعتی دانشگاه فردوسی مشهد (دانشکده کشاورزی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی) تهیه گردیدند.

تهیه کانژوگه‌های مایلارد

کانژوگه‌های مایلارد مطابق روش Chang و همکاران (2011) تولید شدند. برای این منظور، 0/5 گرم کیتوزان در 100 میلی‌لیتر استیک اسید 1 درصد حجمی- حجمی به مدت 1 ساعت روی همزن مغناطیسی حل شد. سپس 1 گرم از قندهای گلوکز، فروکتوز و اینولین به‌طور جداگانه به محلول کیتوزان 0/5 درصد اضافه شده و محلول حاصله تا حل شدن کامل قندها هم‌زده شد. pH محلول با کمک هیدروکسید سدیم 2 مولار روی 0/01 ± 6/07 تنظیم و سپس محلول در فالکون‌های پلاستیکی 50 میلی‌لیتری به مدت 15 دقیقه در دمای 121 درجه سلسیوس اتوکلاو گردید. بعد از فرایند حرارتی، نمونه‌ها سرد شده و آزمون‌های تغییر pH، پیشرفت واکنش قهوه‌ای شدن، تغییرات ساختاری و فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی در سامانه‌های کانژوگه انجام گردید.

اندازه‌گیری pH

تغییرات pH نمونه‌های کانژوگه بعد از فرآیند حرارت‌دهی توسط دستگاه pHمتر (Consort C831، بلژیک) ثبت گردید.

بررسی تولید محصولات میانی و نهایی واکنش مایلارد

تولید محصولات میانی یا حد واسط واکنش مایلارد بین کیتوزان و ساکاریدهای دیگر با اندازه‌گیری جذب فرابنفش نمونه‌ها در طول‌موج 294 نانومتر ($A_{294\ nm}$) با استفاده از اسپکتروفوتومتر (WPA-S2000-UV/Vis، انگلیس) بررسی گردید. سامانه‌های کیتوزان- فروکتوز و کیتوزان-گلوکز جذب بالایی نشان دادند؛ به همین دلیل با آب مقطر و در نسبت 1:2 (آب مقطر: نمونه) رقیق شده و مقدار جذب نهایی در عدد 3 ضرب گردید. شدت قهوه‌ای شدن یا تولید محصولات نهایی سامانه‌های کانژوگه در طول‌موج 420 نانومتر ($A_{420\ nm}$) تخمین زده شد. محلول کیتوزان- ساکارید قبل از حرارت دهی به‌عنوان شاهد استفاده شد (Nooshkam and Madadlou, 2016b).

طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (FTIR)

طیف‌های FTIR نمونه‌های کیتوزان، فروکتوز، گلوکز و کانژوگه‌های حاصله با استفاده از اسپکترومتر به‌دست آمد. برای این منظور، بعد از مخلوط کردن نمونه‌های خشک شده با پتاسیم بروماید و فشرده کردن آن‌ها به شکل قرص، طیف آن‌ها از 400 تا 4000 بر سانتی‌متر و در حالت عبوری[7] به‌دست آمد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر پایه توان کاهندگی

توان کاهندگی سامانه‌های کیتوزان- ساکارید با استفاده از روش Li و همکاران (2013) با اصلاحات مورد نیاز اندازه‌گیری شد. برای این منظور، 1 میلی‌لیتر از نمونه‌های غیرکانژوگه و کانژوگه با 1 میلی‌لیتر آب مقطر و 1 میلی‌لیتر فری سیانید پتاسیم (1 درصد)، ترکیب و محلول حاصله هم‌زده گردید. بعد از حرارت دهی محلول به مدت 20 دقیقه در حمام آب و در دمای 50 درجه سلسیوس، 2/5 میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک 10 درصد به آن اضافه شد و مجدد هم‌زده شد. محلول در 5000 برابر شتاب گرانشی به مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ (Hettich Roto Silenta/K، آلمان) گردید. سپس 2 میلی‌لیتر روشناور با 2 میلی‌لیتر آب مقطر و 1 میلی‌لیتر کلرید آهن ($FeCl_3$) 0/1 درصد مخلوط شد و بعد از هم زدن و نگهداری به مدت 10 دقیقه در دمای محیط، جذب محلول در 700 نانومتر ثبت گردید. نتایج به‌صورت واحد جذب[8] (AU) گزارش شد. جذب بالاتر مخلوط بیانگر توان کاهندگی بالاتر است. از محلول اتانولی BHT با غلظت 15 میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌عنوان آنتی‌اکسیدان استاندارد و جهت مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها استفاده گردید.

فعالیت ضدمیکروبی

از دو روش ضدمیکروبی زیر به‌منظور بررسی فعالیت ضدمیکروبی کانژوگه‌های مایلارد در شرایط برون تنی بر باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *اشرشیاکلی*، کپک *آسپرژیلوس نایجر* و مخمر *کاندیدا آلبیکنس* استفاده گردید.

---

1 *Staphylococcus aureus*
2 *Pseudomonas aeruginosa*
3 *Escherichia coli*
4 *Bacillus subtilis*
5 *Aspergillus niger*
6 *Candida albicans*
7 Transmission mode
8 Absorbance unit

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی[1] به روش میکرودایلوشن براث و تری فنیل تترازولیوم کلراید

20 میکرولیتر از نمونه‌های کانژوگه و غیرکانژوگه (غلظت‌های 15، 7/5 و 3/75 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و 20 میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی (0/5 مک فارلند) به پلیت‌های 96 خانه‌ای استریل اضافه شدند. بعد از گرمخانه‌گذاری پلیت‌ها (دمای 27 درجه سلسیوس به مدت 72 ساعت برای قارچ‌ها و دمای 37 درجه سلسیوس به مدت 24 ساعت برای باکتری‌ها)، 20 میکرولیتر تری فنیل تترازولیوم کلراید 5 درصد به‌عنوان شاخص رنگی رشد به چاهک‌ها اضافه شد و پلیت ها مجدد گرمخانه گذاری گردیدند. در صورتیکه رشد میکروبی رخ داده باشد، رنگ قرمز تیره یا ارغوانی در چاهک‌ها بعد از 24 ساعت برای قارچ‌ها و 0/5 ساعت برای باکتری‌ها قابل مشاهده است. اولین غلظت نمونه‌های کانژوگه و غیر کانژوگه که مانع ظهور رنگ قرمز تیره یا ارغوانی گردید، به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی نمونه‌ها گزارش شد (Behbahani *et al.*, 2017).

تعیین حداقل غلظت کشندگی

مقدار 100 میکرولیتر از چاهک‌های فاقد رنگ قرمز تیره یا ارغوانی آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی روی محیط کشت باکتریایی مولر هیلتون آگار و محیط کشت قارچی سابروز دکستروز آگار کشت داده شد. اولین غلظتی که باعث عدم رشد میکروبی شده بود، به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی نمونه‌های کانژوگه و شاهد گزارش گردید (Behbahani *et al.*, 2017).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

از نرم‌افزار SPSS 21 و آزمون واریانس یک‌طرفه برای تجزیه نتایج و Microsoft excel 2013 برای رسم نمودارها استفاده گردید. میانگین تیمارها با کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح اطمینان 95 درصد ($p<0.05$) مقایسه شد.

نتایج و بحث

تغییرات pH طی واکنش مایلارد

در واکنش مایلارد، اتصال کووالانسی گروه آمین پروتئین با گروه کربونیل قند احیاءکننده و همچنین تولید اسیدهای آلی مانند استیک و فورمیک اسید سبب کاهش pH و اسیدی شدن محیط می‌شود (Liu *et al.*, 2008). نتایج روند تغییرات pH نمونه‌ها بعد از فرآیند حرارتی در جدول 1 گزارش شده است. کانژوگاسیون سبب کاهش معنی‌دار pH نمونه‌ها شد ($p<0.05$) و شدت این کاهش در نمونه کیتوزان- گلوکز و کیتوزان- اینولین نسبت به کانژوگه کیتوزان- فروکتوز بیشتر بود. اختلاف pH در سامانه‌های کیتوزان- ساکارید ممکن است ناشی از واکنش‌پذیری متفاوت قندهای احیاءکننده باشد. در مطالعه‌ای بیان شد که واکنش‌پذیری بیشتر ترکیبات با وزن مولکولی پایین[2] (LMW) نسبت به انواع با وزن مولکولی بالا[3] (HMW) ناشی از دافعه استری کمتر این ترکیبات است. در همین راستا، آلدوپنتوزها نسبت به آلدوهگزوزها و مونوساکاریدها نسبت به دی یا الیگوساکاریدها واکنش‌پذیری بالاتری نشان می‌دهند. علاوه بر این، قندهای کتونی به دلیل وضعیت قرارگیری و دافعه استری بیشتر گروه کربونیل، واکنش‌پذیری کمتری نسبت به نوع آلدوزی دارند (O'Brien *et al.*, 1989). کاهش بیشتر pH در سامانه کیتوزان- گلوکز نسبت به نوع کیتوزان-فروکتوز در این پژوهش، به دافعه استری کمتر گلوکز بر می‌گردد که با سرعت بیشتری با گروه آمین کیتوزان واکنش داده و در نهایت pH کمتری را سبب شده است. در ارتباط با اینولین، بدلیل گروه احیا کننده کمتر نسبت به دو مونوساکارید دیگر، گروه آمین کیتوزان در زمان کمتری به گروه احیا کننده آن متصل شده و در نتیجه فرصت کافی برای تبدیل محصولات میانی به ترکیبات اسیدی را داشته است. در راستای نتایج این تحقیق، کاهش pH و اسیدی شدن محیط واکنش مایلارد در مطالعات مختلف نشان داده شده است (Benjakul *et al.*, 2005; Kim and Lee, 2009).

پیشرفت واکنش گلیکوزیلاسیون

محصولات آمادوری یا هینز از طریق مسیرهای انولیزاسیون 1، 2 و 2، 3 به محصولات میانی واکنش مایلارد از قبیل هیدروکسی متیل فورفورال، فورفورال، ردوکتون و ترکیبات تجزیه‌ای (مانند استول، دی‌استیل و پیرو آلدئید) تبدیل می‌شوند (Martins *et al.*, 2000). از ویژگی‌های اصلی این مرحله می‌توان به تولید رنگ زرد، فلورسانس، طعم یا بد طعمی، دی‌اکسید کربن، افزایش در قدرت کاهندگی و جذب قوی در ناحیه نزدیک به فرابنفش اشاره داشت (Nursten, 2005; Wu *et al.*, 2014). جذب فرابنفش در 294 نانومتر برای ارزیابی مقدار ترکیبات حد واسط استفاده می‌شود (Nooshkam and Madadlou, 2016b). در مرحله نهایی واکنش، پلیمریزاسیون محصولات میانی منجر به تشکیل پلیمرهای قهوه‌ای، نیتروژن دار (3- 4 درصد نیتروژن) و ماکرو مولکول‌هایی به نام ملانوئیدین شده که دارای حداکثر جذب در 420 نانومتر می‌باشند (Vhangani and Van Wyk, 2013; Nursten, 2005).

1 Minimum Inhibitory Concentration (MIC)
2 Low molecular weights
3 High molecular weights

جدول 1- تغییرات pH، محصولات میانی و نهایی واکنش مایلارد بین کیتوزان- اینولین/ فروکتوز/ گلوکز

تیمار	پارامتر			
	pH	شدت ترکیبات میانی ($A_{294\ nm}$)	شدت قهوه‌ای شدن ($A_{420\ nm}$)	نسبت جذبی (A_{294nm}/A_{420nm})
کیتوزان- گلوکز0**	6/07 ± 0/01 a			
کیتوزان- گلوکز	5/94 ± 0/01 b	1/767± 0/301 a*	0/294± 0/016 a***	5/991± 0/707 a
کیتوزان- فروکتوز0	6/08 ± 0/00 a			
کیتوزان- فروکتوز	5/98 ± 0/00 c	2/370± 0/119 b	0/224± 0/019b	10/620± 0/376b
کیتوزان- اینولین0	6/07 ± 0/01 a			
کیتوزان- اینولین	5/93 ± 0/02 b	1/570± 0/033 a	0/409± 0/024 c	3/843± 0/143 c

* اختلاف بین تیمارها در هر ستون در سطح اطمینان 95 درصد (p<0.05) معنی‌دار است.

** عدد صفر بیانگر محلول کیتوزان- ساکارید قبل از فرآیند حرارتی می‌باشد.

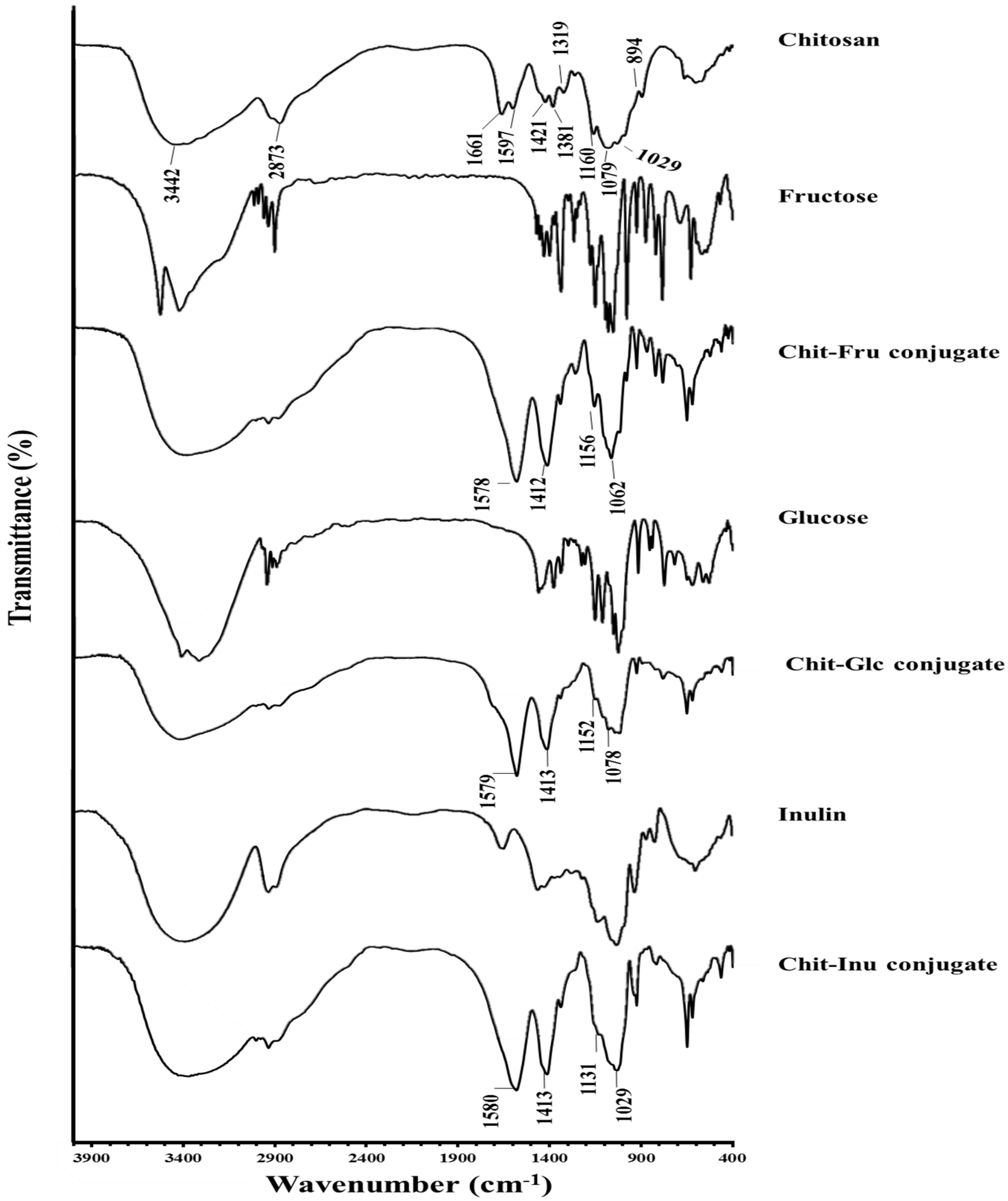
*** جذب به‌عنوان فاکتوری از غلظت ترکیبات بیان شده و جذب بیشتر بیانگر افزایش غلظت ترکیبات می‌باشد.

ترکیبات LWM غیراشباع با پیوند دوگانه مزدوج و همچنین ترکیبات HMW چند حلقه‌ای مانند پیریدن و پیروزین به‌عنوان عوامل ایجادکننده رنگ ملانوئیدین‌ها شناخته شده‌اند (Labuza *et al.*, 1998; Akagawa *et al.*, 2002). مطابق نتایج جدول 1، واکنش مایلارد سبب تولید مقادیر قابل‌توجهی از محصولات میانی و نهایی شده است. بالاترین میزان ترکیبات حد واسط در سامانه کیتوزان- فروکتوز مشاهده شد و سامانه‌های کیتوزان- گلوکز و کیتوزان- اینولین به‌ترتیب میزان کمتری نشان دادند. در ارتباط با شدت قهوه‌ای شدن، بالاترین و کمترین میزان به‌ترتیب در کانژوگه‌های اینولین- کیتوزان و فروکتوز- کیتوزان مشاهده شد. میزان بالاتر محصولات میانی سامانه کیتوزان- فروکتوز نسبت به‌جز کیتوزان- گلوکز ممکن است ناشی از واکنش‌پذیری پایین‌تر آن باشد که با سرعت کمتری در واکنش شرکت کرده و فرصت کافی برای تبدیل این محصولات به ملانوئیدین‌ها را پیدا نکرده است. در حالیکه در زمان یکسان و به دلیل واکنش‌پذیری بالاتر گلوکز، میزان بیشتری از محصولات میانی در سامانه گلوکز- کیتوزان به ترکیبات نهایی تبدیل شده‌اند که نسبت جذبی ($A_{294\ nm/420\ nm}$) این فرضیه را تأیید می‌کند. این نسبت شاخصی از پیشرفت پلیمریزاسیون (تبدیل محصولات حد واسط به نهایی) است و مقدار کمتر آن بیانگر پیشرفت پلیمریزاسیون بیشتر می‌باشد. در ارتباط با سامانه کیتوزان- اینولین، کمترین نسبت جذبی یا به عبارت دیگر بالاترین پیشرفت پلیمریزاسیون مشاهده شد؛ اینولین در وزن برابر دارای مولکول‌ها و متعاقباً گروه‌های کربونیل کمتری نسبت به گلوکز و فروکتوز است که این گروه‌ها در زمان کمتری با گروه آمین کیتوزان واکنش داده و در نتیجه فرصت کافی برای تبدیل ترکیبات حد واسط به ملانوئیدین فراهم می‌شود. لازم به ذکر است که اینولین تحت دماهای بالا و در حضور آب متحمل هیدرولیز و شکستن پیوند گلیکوزیدی می‌شود که این تغییرات در واحدهای فروکتوز انتهایی راحت‌تر رخ می‌دهند (He, 2015). حرارت دهی سامانه‌های پروتئین- قند احیاءکننده سبب تولید مقادیر قابل‌توجهی از محصولات میانی و نهایی می‌گردد (Vhangani and Van Wyk, 2013; Kim and Lee, 2009; Phisut and Jiraporn, 2013).

تغییرات ساختاری

طیف‌های FTIR نمونه‌های کانژوگه و قندهای احیاءکننده در شکل 1 نشان داده شده است. باندهای جذبی در حدود 3442 و 2873 بر سانتی‌متر در طیف کیتوزان مربوط به ارتعاش کششی -OH، CH- و NH- و همچنین پیوندهای هیدروژنی درون و برون مولکولی در این پلیمر می‌باشند. پیک 1160 بر سانتی‌متر به تقارن کششی پیوند C-O-C- و پیک‌های 1079 و 1029 بر سانتی‌متر به ارتعاش کششی پیوند -C-O- نسبت داده می‌شوند. پیک‌های 1661 و 1597 بر سانتی‌متر به‌ترتیب بیانگر باندهای جذبی آمید I و گروه‌های آمین اولیه کیتوزان بوده که بعد از واکنش مایلارد دستخوش تغییراتی شده‌اند؛ پیک جذبی 1661 بر سانتی‌متر کاهش و به 1578 بر سانتی‌متر (در کانژوگه کیتوزان- فروکتوز)، 1579 بر سانتی‌متر (در کانژوگه کیتوزان- گلوکز) یا 1580 بر سانتی‌متر (در کانژوگه کیتوزان- اینولین) جابجا شد که بیانگر کشش گروه C-N و گروه پیوند دوگانه C=N– است و تشکیل باز شیف (پیوند دوگانه C=N) بین انتهای احیا کننده‌ی قند و گروه آمین کیتوزان را تأیید می‌کند. علاوه بر این، ظهور پیک جدید در حدود 1412 بر سانتی‌متر (در کانژوگه کیتوزان- فروکتوز) و 1413 بر سانتی‌متر (در کانژوگه کیتوزان- گلوکز/ اینولین) و همچنین ناپدید شدن باند 1597 بر سانتی‌متر کیتوزان بعد از واکنش بیانگر اتصال قند احیاءکننده با کیتوزان می‌باشد (Gullón *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2015). نتایج مشابهی توسط Gullón و همکاران (2016) و Zhang و

همکاران (2015) در مورد کانژوگه‌های کیتوزان- گلوکز و کیتوزان-فروکتوز گزارش شده است.



شکل 1-طیف FTIR کانژوگه‌های مایلارد کیتوزان- فروکتوز، کیتوزان- گلوکز و کیتوزان- اینولین

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

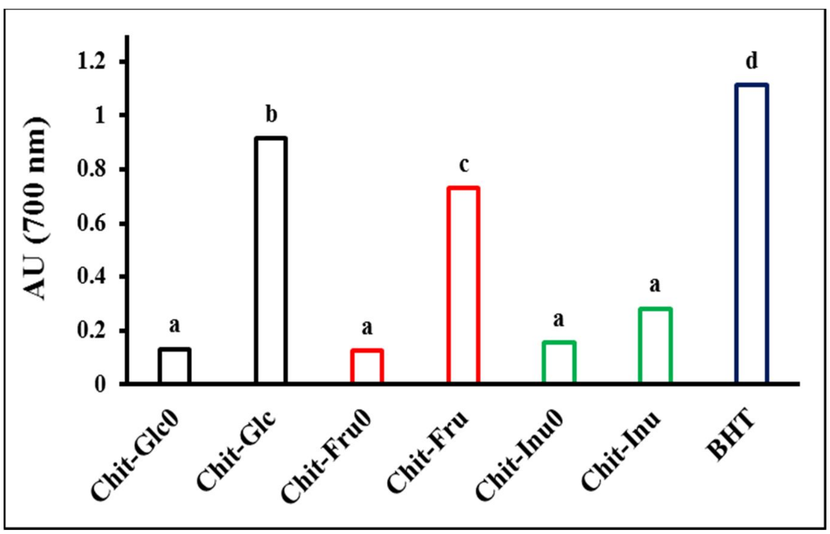
آنتی‌اکسیدان‌ها قادر به احیای کمپلکس کلرید آهن- فری سیانید به آهن فروس (Fe^{2+}) می‌باشند که غلظت آهن فروس تولیدی با اندازه‌گیری رنگ آبی پرل پروشن[1] محلول در 700 نانومتر پایش می‌گردد (Vhangani and Van Wyk, 2013). این آزمون به‌طور گسترده‌ای برای ارزیابی فعالیت ضداکسیدانی MRPs مورد استفاده قرار می‌گیرد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی کانژوگه‌های مایلارد و نمونه‌های غیرکانژوگه در شکل 2 آورده شده است. قدرت کاهندگی سامانه‌های

1 Perl's Prussian blue color

کیتوزان-ساکارید بعد از فرایند حرارتی بهبود یافت. اگرچه این افزایش در سامانه‌های کیتوزان- گلوکز و کیتوزان- فروکتوز معنی‌دار بود ($p<0.05$)، اما کانژوگه‌ی اینولین- کیتوزان اختلاف معنی‌داری با نمونه کنترل نشان نداد ($p>0.05$).

فعالیت کاهندگی نمونه‌های کانژوگه کمتر از آنتی‌اکسیدان سنتزی BHT بود و از بین سامانه‌های کانژوگه، کیتوزان- گلوکز نزدیک‌ترین فعالیت آنتی‌کسیدانی به BHT را نشان داد. گروه‌های هیدروکسیل و پیرول MRPs نقش مهمی در فعالیت احیاءکنندگی این ترکیبات از طریق انتقال الکترون ایفا می‌کنند (Vhangani and Van Wyk, 2013; Jiang *et al.*, 2013). فعالیت شکستن زنجیره رادیکالی ردوکتون‌های تولید شده در مرحله حد واسط به‌واسطه دادن یک اتم هیدروژن، به‌عنوان سازوکار دیگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات گزارش شده است (Wang *et al.*, 2013).

در مطالعه‌ای مشخص شد که MRPs به‌دست آمده از سامانه‌های پروتئین- قند دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمتری نسبت به سامانه‌های اسیدآمینه- قند می‌باشند (Lingnert and Eriksson, 1980). علاوه بر این، پپتیدهای LMW قابلیت واکنش سریع‌تر و اتصال آسان‌تر با قندها را داشته و در نتیجه قادر به تولید ترکیبات فرار با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عالی هستند (Yu *et al.*, 2018). به‌نظر می‌رسد که این فرضیه در مورد قندهای گلوکز، فروکتوز و اینولین نیز قابل تعمیم است؛ گلوکز واکنش‌پذیری بیشتر و متعاقباً ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نشان داد. Jing و همکاران (2011) نشان دادند که حرارت‌دهی ترکیب فروکتوز یا اینولین با پروتئین‌های سفیده تخم‌مرغ (آلبومین، اووموکوئید و لیزوزیم) سبب بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌ها گردید. سامانه فروکتوز- لیزوزیم فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به نوع اینولین- لیزوزیم داشت؛ در حالیکه اووموکوئید ترکیباتی با اثر آنتی‌اکسیدانی بالاتری با اینولین تولید کرد و گلایکه کردن آلبومین با فروکتوز یا اینولین تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان نداد. Phisut و Jiraporn (2013) با گلایکه کردن کیتوزان با قندهای مختلف بیان داشتند که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کانژوگه کیتوزان- گلوکز بالاتر از نوع کیتوزان- فروکتوز است که در راستای نتایج این تحقیق می‌باشد.



شکل 2- فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های غیرکانژوگه (کنترل)، کانژوگه (Chit-Glc، کیتوزان-گلوکز؛ Chit-Fru، کیتوزان-فروکتوز؛ Chit-Inu، کیتوزان-اینولین) و BHT. عدد صفر بیانگر نمونه کنترل می‌باشد.

فعالیت ضدمیکروبی

نتایج حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی نمونه‌های کانژوگه و غیرکانژوگه در شرایط برون‌تنی در جدول 2 گزارش شده است. کانژوگه‌های کیتوزان- فروکتوز و کیتوزان- اینولین حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی کمتری در برابر باکتری‌ها، *آسپرژیلوس نایجر* و *کاندیدا آلبیکنس* نسبت به مخلوط غیرحرارت دیده نشان دادند؛ نمونه‌های کانژوگه اثر مهارکنندگی و کشندگی خود را در غلظت کمتری نشان دادند. با این حال، نتایج یکسانی در ارتباط با فعالیت ضدمیکروبی مخلوط کیتوزان- گلوکز و کانژوگه آن به‌دست آمد. فعالیت ضدمیکروبی مخلوط کیتوزان و ساکارید قبل از حرارت‌دهی (زمان صفر) به دلیل اثر ضدمیکروبی پلی‌ساکارید کیتوزان می‌باشد؛ این ترکیب دارای گروه آمین پروتونه شده بوده که با تشکیل نیروهای الکتروستاتیکی با گروه‌های باردار منفی در سطح سلول، نقش ضدمیکروبی خود را در برابر باکتری‌ها و قارچ‌ها ایفا می‌کند (Beverlya *et al.*, 2008). به‌طور کلی سه سازوکار ضدمیکروبی برای کیتوزان پیشنهاد شده است؛ (1) این ترکیب به دلیل گروه آمین با بار الکتریکی مثبت قابلیت ایجاد کمپلکس با

ترکیبات آنیونی مانند پروتئین‌ها و لیپوپلی‌ساکاریدهای واقع در دیواره سلولی میکروارگانیسم را داشته و از این طریق باعث اختلال در نفوذپذیری دیواره و نشت ترکیبات ضروری به بیرون سلول می‌شود، (2) کیتوزان قادر به از دسترس خارج کردن مواد مغذی مورد نیاز سلول (به دلیل ویژگی شلاته‌کنندگی) و جلوگیری از ورد آن‌ها به داخل سلول است و (3) در نهایت ممکن است بعد از ورود به داخل سلول و تشکیل کمپلکس با DNA میکروارگانیسم، از سنتز ترکیبات ضروری سلول مانند RNA و پروتئین جلوگیری کند (Prashanth and Tharanathan, 2007).

گزارش شده است که حرارت‌دهی محلول حاوی پروتئین و قند احیاءکننده سبب تولید ترکیبات نهایی قهوه‌ای رنگ (ملانوئیدین) با فعالیت ضدمیکروبی می‌شود. اثر ضدمیکروبی ملانوئیدین‌ها تابع غلظت این ترکیبات زیست فعال می‌باشد؛ بطوریکه نقش باکتریواستاتیکی[2] و باکتری‌کشی[3] خود را به‌ترتیب در غلظت‌های کم و زیاد ایفا می‌کنند. ویژگی ضدمیکروبی ملانوئیدین‌ها به قابلیت شلاته‌کنندگی فلز آن‌ها بر می‌گردد. در غلظت پایین، فلز آهن که برای رشد میکروارگانیسم‌ها ضروری است را از محیط کشت جذب کرده و سبب توقف رشد آن‌ها می‌شود (اثر باکتریواستاتیکی)، در حالیکه غلظت بالای آن در محیط با شلاته کردن یون منیزیم (Mg^{2+}) از غشای خارجی، ناپایداری غشاهای داخلی و خارجی را تسریع می‌کند (Rufián-Henares and Morales, 2008b; Rufián-Henares and de la Cueva, 2009).

جدول 2- حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی نمونه‌های کانژوگه و غیر کانژوگه در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا.

تیمار	*B. subtilis*	*E. coli*	*P. aeruginosa*	*S. aureus*	*A. niger*	*C. albicans*
	میکروارگانیسم					
	حداقل غلظت مهارکنندگی رشد (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)					
کیتوزان- گلوکز0*	7/5	7/5	7/5	7/5	7/5	15
کیتوزان- گلوکز	7/5	7/5	7/5	7/5	7/5	15
کیتوزان- فروکتوز0	15	15	15	15	-	-
کیتوزان- فروکتوز	7/5	7/5	7/5	7/5	7/5	15
کیتوزان- اینولین0	15	15	15	15	15	15
کیتوزان- اینولین	7/5	7/5	7/5	7/5	7/5	7/5
	حداقل غلظت کشندگی (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)					
کیتوزان- گلوکز0	≥ 7/5	≥ 7/5	≥ 7/5	≥ 7/5	≥ 7/5	≥ 15
کیتوزان- گلوکز	≥ 7/5	≥ 7/5	≥ 7/5	≥ 7/5	≥ 7/5	≥ 15
کیتوزان- فروکتوز0	≥ 15	≥ 15	≥ 15	≥ 15	> 15	> 15
کیتوزان- فروکتوز	≥ 7/5	≥ 7/5	≥ 7/5	≥ 7/5	≥ 7/5	≥ 15
کیتوزان- اینولین0	≥ 15	≥ 15	≥ 15	≥ 15	≥ 15	≥ 15
کیتوزان- اینولین	≥ 7/5	≥ 7/5	≥ 7/5	≥ 7/5	≥ 7/5	≥ 7/5

* عدد صفر بیانگر محلول کیتوزان- ساکارید قبل از فرآیند حرارتی می‌باشد.

در مطالعاتی که توسط Rufián-Henares و همکاران (2009) انجام شد، اثر ضدمیکروبی ملانوئیدین‌های به‌دست آمده از مواد غذایی مانند قهوه و همچنین سامانه‌های مدل حرارت دیده (24 ساعت در دمای 100 درجه سلسیوس) در برابر باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به نوع گرم منفی *اشرشی کلی* بالاتر بود. علاوه بر این، ملانوئیدین‌های HMW و تیره‌رنگ بیسکویت دارای فعالیت ضدمیکروبی بیشتری نسبت به انواع LMW در برابر *اشرشیاکلی* بودند و شدت حرارت‌دهی بالاتر به‌کار رفته در تولید محصولاتی مانند قهوه برشته، منجر به تشکیل ملانوئیدین‌هایی با ویژگی ضدمیکروبی بالاتر شد (Rufián-Henares and de la Cueva, 2009; Rufián-Henares and Morales, 2008a; Rufián-Henares and Morales, 2008b; Rufián-Henares and Morales, 2006).

در این پژوهش، با اینکه حرارت‌دهی مخلوط کیتوزان- گلوکز سبب تولید کانژوگه‌هایی با ترکیبات قهوه‌ای رنگ (شاخص ترکیبات نهایی و ملانوئیدین) معنی‌داری گردید، این ترکیب حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی مشابه‌ای با نمونه غیرکانژوگه نشان داد. این حالت ممکن است ناشی از برهمکنش‌های عرضی بیشتر در این سامانه باشد؛ با توجه

2 Bacteriostatic

3 Bactericidal

به واکنش‌پذیری بالای آن، مقدار بالایی از ملانوئیدین‌ها تولید شده و ادامه حرارت‌دهی سبب ایجاد اتصالات عرضی بیشتری بین ملانوئیدین‌ها شده است که کاهش گروهای شلاته‌کننده فلز در سطح آن‌ها و در نهایت کاهش فعالیت ضدمیکروبی را سبب شده است. در سامانه کیتوزان-فروکتوز، با اینکه مقدار ترکیبات نهایی ($Abs_{420\ nm}$) کمتری در مقایسه با سامانه کیتوزان- گلوکز داشت، اما اثر باکتریواستاتیکی و باکتری کشی خود را در غلظت کمتری نسبت به نمونه غیرکانژوگه نشان داد. اثر ضدمیکروبی کانژوگه اینولین- کیتوزان در راستای نتایج شدت قهوه‌ای شدن می‌باشد. به‌نظر می‌رسد که اینولین به دلیل وزن مولکولی بالاتر نسبت به دو مونوساکارید فروکتوز و گلوکز، کانژوگه‌هایی بزرگ‌تر به همراه گروه‌های شلاته‌کننده بیشتر تولید کرده است. علاوه بر این، لازم به ذکر است که بخشی از اثر ضدمیکروبی کانژوگه کیتوزان- اینولین ناشی از ویژگی ضدباکتریایی اینولین است. مطابق نتایج، می‌توان بیان نمود که سامانه‌های کانژوگه اینولین- کیتوزان و فروکتوز- کیتوزان را می‌توان به‌عنوان مواد ضدمیکروب بالقوه به‌کار برد. در راستای نتایج این پژوهش، گزارش شده است که ترکیبات حاصل از واکنش مایلارد اثر ضدباکتریایی خود را از طریق ویژگی آنتی‌اکسیدانی، فعالیت سطحی بالاتر (ناپایدار کردن غشای خارجی) و جلوگیری از جذب سرین، اکسیژن، گلوکز و آنزیم‌های کاتابولیزکننده کربوهیدرات در میکروارگانیسم‌ها ایفا می‌کنند (Muppalla *et al*., 2012).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، کیتوزان با استفاده از واکنش مایلارد با اینولین، فروکتوز و گلوکز گلیکوزیله شد. کانژوگه شدن کیتوزان با کاهش pH، افزایش شدت محصولات حد واسط و نهایی و همچنین تغییرات ساختاری ایجاد شده در کیتوزان تأیید گردید. واکنش کانژوگاسیون سبب تولید محصولاتی با ویژگی آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجه شد. علاوه بر این، فعالیت ضدمیکروبی سامانه‌های کیتوزان- اینولین/ فروکتوز بعد از حرارت‌دهی افزایش یافت و این کانژوگه ها، حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی کمتری نسبت به نمونه‌های غیرکانژوگه نشان دادند. با توجه به نتایج این مطالعه، می‌توان از واکنش مایلارد جهت بهبود ویژگی‌های بیولوژیکی کیتوزان و تولید محصولاتی زیست فعال با فعالیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجه استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل مساعدت‌های مالی در اجرای این طرح پژوهشی (کد 47380) صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Akagawa, M., Sasaki, T., & Suyama, K., 2002, Oxidative deamination of lysine residue in plasma protein of diabetic rats. *The FEBS Journal*, 269(22), 5451-5458.

Behbahani, B. A., Shahidi, F., Yazdi, F. T., Mortazavi, S. A., & Mohebbi, M., 2017, Antioxidant activity and antimicrobial effect of tarragon (*Artemisia dracunculus*) extract and chemical composition of its essential oil. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(2), 847-863.

Benjakul, S., Lertittikul, W., & Bauer, F., 2005, Antioxidant activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein–sugar model system. *Food Chemistry*, 93(2), 189-196.

Beverlya, R. L., Janes, M. E., Prinyawiwatkula, W., & No, H. K., 2008, Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of Listeria monocytogenes. *Food Microbiology*, 25(3), 534-537.

Chang, H. L., Chen, Y. C., & Tan, F. J., 2011, Antioxidative properties of a chitosan–glucose Maillard reaction product and its effect on pork qualities during refrigerated storage. *Food chemistry*, 124(2), 589-595.

de Oliveira, F. C., Coimbra, J. S. D. R., de Oliveira, E. B., Zuñiga, A. D. G., & Rojas, E. E. G., 2016, Food protein-polysaccharide conjugates obtained via the maillard reaction: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(7), 1108-1125.

Devlieghere, F., Vermeulen, A., & Debevere, J., 2004, Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food microbiology*, 21(6), 703-714.

Gullón, B., Montenegro, M. I., Ruiz-Matute, A. I., Cardelle-Cobas, A., Corzo, N., & Pintado, M. E., 2016, Synthesis, optimization and structural characterization of a chitosan–glucose derivative obtained by the Maillard reaction. *Carbohydrate polymers*, 137, 382-389.

He, Y., 2015, *Improved heat stability of whey protein isolate by glycation with inulin*. University of Missouri-Columbia.

Jiang, Z., Rai, D. K., O'Connor, P. M., & Brodkorb, A., 2013, Heat-induced Maillard reaction of the tripeptide IPP and ribose: Structural characterization and implication on bioactivity. *Food research international*, 50(1), 266-274.

Jing, H., Yap, M., Wong, P. Y., & Kitts, D. D., 2011, Comparison of physicochemical and antioxidant properties of egg-white proteins and fructose and inulin Maillard reaction products. *Food and Bioprocess Technology*, 4(8), 1489-1496.

Kalyani Nair, K., Kharb, S., & Thompkinson, D. K., 2010, Inulin dietary fiber with functional and health attributes—a review. *Food Reviews International*, 26(2), 189-203.

Karimi, R., Azizi, M. H., Ghasemlou, M., & Vaziri, M., 2015, Application of inulin in cheese as prebiotic, fat replacer and texturizer: A review. *Carbohydrate Polymers*, 119, 85-100.

Kim, J. S., & Lee, Y. S., 2009, Study of Maillard reaction products derived from aqueous model systems with different peptide chain lengths. *Food Chemistry*, 116(4), 846-853.

Kumar, M. N. R., 2000, A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers*, *46*(1), 1-27.

Labuza, T. P., Monnier, V., Baynes, J., & O'Brien, J. (Eds.), 1998, *Maillard reactions in chemistry, food and health*. Elsevier.

Li, X., Shi, X., Jin, Y., Ding, F., & Du, Y., 2013, Controllable antioxidative xylan–chitosan Maillard reaction products used for lipid food storage. *Carbohydrate polymers*, 91(1), 428-433.

Lingnert, H., & Eriksson, C. E., 1980, Antioxidative Maillard reaction products. II. Products from sugars and peptides or protein hydrolysates. *Journal of Food Processing and Preservation*, 4(3), 173-181.

Liu, S. C., Yang, D. J., Jin, S. Y., Hsu, C. H., & Chen, S. L., 2008, Kinetics of color development, pH decreasing, and anti-oxidative activity reduction of Maillard reaction in galactose/glycine model systems. *Food Chemistry*, 108(2), 533-541.

Lopes, S. M., Krausová, G., Rada, V., Gonçalves, J. E., Gonçalves, R. A., & de Oliveira, A. J., 2015, Isolation and characterization of inulin with a high degree of polymerization from roots of Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni. *Carbohydrate research*, 411, 15-21.

Martins, S. I., Jongen, W. M., & Van Boekel, M. A., 2000, A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modelling. *Trends in Food Science & Technology*, 11(9), 364-373.

Matsuhashi, S., & Kume, T., 1997, Enhancement of antimicrobial activity of chitosan by irradiation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 73(2), 237-241.

Mcdevitt-Pugh, M., & Meyer, D., 2005, Low glycemic index products with inulin to support weight management. *Wellness Foods Europe*, 34, 20-24.

Muppalla, S. R., Sonavale, R., Chawla, S. P., & Sharma, A., 2012, Functional properties of nisin–carbohydrate conjugates formed by radiation induced Maillard reaction. *Radiation Physics and Chemistry*, 81(12), 1917-1922.

Mutanda, T., Mokoena, M. P., Olaniran, A. O., Wilhelmi, B. S., & Whiteley, C. G., 2014, Microbial enzymatic production and applications of short-chain fructooligosaccharides and inulooligosaccharides: recent advances and current perspectives. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 41(6), 893-906.

Nooshkam, M., & Madadlou, A., 2016a, Maillard conjugation of lactulose with potentially bioactive peptides. *Food Chemistry*, 192, 831-836.

Nooshkam, M., & Madadlou, A., 2016b, Microwave-assisted isomerisation of lactose to lactulose and Maillard conjugation of lactulose and lactose with whey proteins and peptides. *Food chemistry*, 200, 1-9.

Nursten, H. E., 2005, *The Maillard reaction: chemistry, biochemistry, and implications*. Royal Society of Chemistry.

O'Brien, J., Morrissey, P. A., & Ames, J. M., 1989, Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 28(3), 211-248.

Phisut, N., & Jiraporn, B., 2013, Characteristics and antioxidant activity of Maillard reaction products derived from chitosan-sugar solution. *International Food Research Journal*, 20(3).

Prashanth, K. H., & Tharanathan, R. N., 2007, Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential—an overview. *Trends in food science & technology*, 18(3), 117-131.

Rufián-Henares, J. A., & de la Cueva, S. P., 2009, Antimicrobial Activity of Coffee Melanoidins. A Study of Their Metal-Chelating Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(2), 432-438.

Rufián-Henares, J. A., & Morales, F. J., 2006, A new application of a commercial microtiter plate-based assay for assessing the antimicrobial activity of Maillard reaction products. *Food Research International*, 39(1), 33-39.

Rufián-Henares, J. A., & Morales, F. J., 2008a, Microtiter plate-based assay for screening antimicrobial activity of melanoidins against *E. coli* and *S. aureus*. *Food chemistry*, 111(4), 1069-1074.

Rufián-Henares, J. A., & Morales, F. J., 2008b, Antimicrobial activity of melanoidins against Escherichia coli is mediated by a membrane-damage mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7), 2357-2362.

Schaller-Povolny, L. A., & Smith, D. E., 1999, Sensory attributes and storage life of reduced fat ice cream as related to inulin content. *Journal of Food Science*, 64(3), 555-559.

Shahidi, F., 2000, Antioxidants in food and food antioxidants. *Food/nahrung*, 44(3), 158-163.

Vhangani, L. N., & Van Wyk, J., 2013, Antioxidant activity of Maillard reaction products (MRPs) derived from fructose–lysine and ribose–lysine model systems. *Food Chemistry*, *137*(1), 92-98.

Wang, H. Y., Qian, H., & Yao, W. R., 2011, Melanoidins produced by the Maillard reaction: Structure and biological activity. *Food Chemistry*, 128(3), 573-584.

Wang, W. Q., Bao, Y. H., & Chen, Y., 2013, Characteristics and antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products from interactions in a whey protein isolate and sugars system. *Food Chemistry*, 139(1), 355-361.

Wang, X., Du, Y., & Liu, H., 2004, Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan–Zn complex. *Carbohydrate polymers*, 56(1), 21-26.

Wang, X., Du, Y., Fan, L., Liu, H., & Hu, Y., 2005, Chitosan-metal complexes as antimicrobial agent: synthesis, characterization and structure-activity study. *Polymer Bulletin*, 55(1-2), 105-113.

Wu, S., Hu, J., Wei, L., Du, Y., Shi, X., & Zhang, L., 2014, Antioxidant and antimicrobial activity of Maillard reaction products from xylan with chitosan/ chitooligomer/ glucosamine hydrochloride/ taurine model systems. *Food Chemistry*, 148, 196-203.

Yu, M., He, S., Tang, M., Zhang, Z., Zhu, Y., & Sun, H., 2018, Antioxidant activity and sensory characteristics of Maillard reaction products derived from different peptide fractions of soybean meal hydrolysate. *Food Chemistry*, 243, 249-257.

Yuan, D., Xu, Y., Wang, C., Li, Y., Li, F., Zhou, Y., & Jiang, Y., 2015, Comparison of anti-browning ability and characteristics of the fractionated Maillard reaction products with different polarities. *Journal of Food Science and Technology*, 52(11), 7163-7172.

Zhang, H., Yang, J., & Zhao, Y., 2015, High intensity ultrasound assisted heating to improve solubility, antioxidant and antibacterial properties of chitosan-fructose Maillard reaction products. *LWT-Food Science and Technology*, 60(1), 253-262.

Zhong, N. J., Liu, G. Q., Zhao, X. H., Gao, Y. Q., Li, L., & Li, B., 2015, Lipid Peroxidation Inhibitation Activity of Maillard Reaction Products Derived from Sugar-amino Acid Model Systems. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 9(5), 393-397.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 16, No. 1, Apr. May. 2020, p. 117- 129

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 16، شماره 1،فروردین-اردیبهشت 1399 ص.129-117

Chemical modification of chitosan through non-enzymatic glycosylation reaction to improve its antimicrobial and anti-oxidative properties

F. Shahidi[*1], F. Tabatabaei Yazdi[1], M. Nooshkam[2], Z. Zareie[3], F. Falah[3]

Received: 2018.10.04
Accepted: 2019.03.04

Introduction: Lipid oxidation leads to the generation of off-flavors and potential toxic compounds. Synthetic antioxidants are frequently applied for inhibiting this reaction, however; there is a concern regarding to the potent toxic effects of synthetic antioxidants on human health. The non-enzymatic glycosylation reaction (Maillard reaction) has been broadly used to ameliorate the biological and functional features of proteins and polysaccharides. The Maillard reaction produces products with versatile functions such as antioxidant, antimicrobial, antihypertensive, anti-browning, and prebiotic properties. In this regard, the Maillard reaction products (MRPs) can be used in the food industry to inhibit the oxidation reaction due to their superb antioxidant effect. In this study, chitosan was glycosylated with inulin, fructose, and glucose. Chitosan is a chitin derivative with cationic nature having antimicrobial, antioxidant, metal chelation, and film-forming features. Inulin is recognized as a prebiotic sugar with vast applications in food and pharmaceutical sciences. The purpose of this study was to chemically modify chitosan through the Maillard reaction in order to boost its antioxidant and antimicrobial properties.

Materials and methods: Chitosan (0.5% w/v) was dissolved in 1.0% v/v acetic acid solution followed by stirring for 1.0 h at room temperature. Afterwards, sugars inulin, glucose, and fructose were separately added to the chitosan solution at final concentration of 1.0% w/v. The obtained solutions were then stirred until complete sugar dissolution. The pH of solution was adjusted to 6.07 by adding 2.0 M sodium hydroxide and then the chitosan-sugar Maillard conjugates were fabricated through autoclaving the solutions at 121 °C. Changes in pH after the reaction were measured using a pH meter. The extent of the Maillard reaction was estimated via measuring the absorbance of the conjugated solutions at 294 nm (the intermediate products) and 420 nm (final products). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy at transmission mode and 400-4000 cm^{-1} was employed to evaluate the structural changes of chitosan upon conjugation. Antioxidant activity of the conjugates was evaluated based on the reducing power assay. One mL of the samples was charged with 1.0 mL of distilled water and 1.0 mL of potassium ferricyanide (1.0% w/v). The solution was mixed and incubated at 50 °C for 20 min. After adding 2.5 mL of tri-chloroacetic solution (10% w/v), the obtained solution was centrifuged at 5000 g for 5.0 min. Afterwards, 2.0 mL of the supernatant was mixed with 2.0 mL of distilled water and 1.0 mL of ferric chloride (0.1% w/v). The solution was stand for 10 min at ambient temperature and then its absorbance was recorded at 700 nm. Antimicrobial effect of the conjugates against pathogenic microorganisms (*E. coli, S. aureus, B. subtilis, P. aeruginosa, A. niger*, and *C. albicans*) was measured according to the minimum inhibitory (MIC) and microbiocidal (MBC) concentrations. SPSS software (version 21) and one-way ANOVA were applied for data analysis. Duncan's multiple range test was employed to determine the differences between means.

Results & discussion: The Maillard reaction led to a significant decrement in pH value of chitosan-saccharide systems, mainly due to the covalent coupling of amino groups of chitosan to carbonyl groups of reducing sugars in conjugation with the production of acetic and formic acids. The highest intermediate compounds (A_{294nm}) and lowest browning intensity (A_{420nm}) observed in chitosan-fructose conjugate, which was likely attributed to the lower reactivity of fructose. Chitosan-inulin conjugate presented the highest A_{420nm} and lowest intermediate-to-final ratio (A_{294nm}/A_{420nm}), probably due to the lower inulin molecules and subsequently carbonyl groups compared to fructose and glucose. These groups may react with amino groups of chitosan at initial reaction times, leading more conversion rate of the intermediate compounds to the final ones. FTIR spectra of the chitosan and conjugates revealed that absorbance peak at 1661 cm^{-1} in chitosan spectrum decreased and shifted to 1578 cm^{-1} (in chitosan-fructose conjugate), 1579 cm^{-1} (in chitosan-glucose conjugate), and 1580 cm^{-1} (in chitosan-inulin conjugate), indicating the stretching C-N group and -C=N group and the formation of Schiff base (-C=N) between reducing end of the saccharides and amino groups of chitosan. Reducing power of the chitosan-saccharide systems improved after the thermal process. Although, chitosan-glucose and chitosan-fructose conjugates had significantly higher reducing power than unconjugated counterparts, but chitosan-inulin conjugate showed

1, 2 and 3. Professor, PhD student and MSc student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran .
(*- Corresponding Author Email: fshahidi@um.ac.ir)

non-significantly improved antioxidant activity compared to its non-heated mixture. Antioxidant activity of the Maillard conjugates was ascribed from the electron donating ability of their hydroxyl and pyrrole groups. The conjugates had lower MIC and MBC in comparison to their unconjugated pairs, except for chitosan-glucose conjugate, which showed no differences in MIC and MBC compared with its non-heated mixture. Antimicrobial property of the Maillard products, especially melanoidins has been attributed to their metal chelating features; melanoidins exert a bacteriostatic effect at low concentration and bactericidal effect at high levels through sequestering ionic iron from medium and magnesium from outer membrane, leading to the cell membranes destabilization. Additionally, antioxidant capacity, high surface activity, and inhibiting effect towards catabolic enzymes have been reported as another antimicrobial mechanisms of the Maillard products. In general, it can be concluded that chitosan-saccharide Maillard-based conjugates, particularly inulin-chitosan one could be used in the food sector as a novel prebiotic-based active bio-compound with antioxidant and antimicrobial features.

Keywords: Inulin; Antioxidant; Antimicrobial; Chitosan; Maillard reaction.